

## 明 細 書

### 植物材料への遺伝子導入を行う方法

#### 技術分野

- [0001] 本出願は、2003年8月13日に提出された日本国特許出願2003-293125に基づく優先権を主張する。
- [0002] 本発明は、アグロバクテリウム属細菌を介して植物材料への遺伝子導入を行う方法に関する。

#### 背景技術

- [0003] アグロバクテリウム法による遺伝子導入は、アグロバクテリウムの機能を利用した植物の形質転換方法である。土壌細菌アグロバクテリウム(*Agrobacterium tumefaciens*)は、植物に感染すると、アグロバクテリウムの病原性に関与しているTi(tumor-inducing)プラスミドの一部であるT-DNAが植物ゲノムに組み込まれる機能を有している。アグロバクテリウム法による植物の形質転換方法は、TiプラスミドのT-DNA領域を植物ゲノムに導入を所望する遺伝子に置き換えた形質転換用プラスミドを調製し、当該形質転換用プラスミドをTiプラスミドの代わりに有するように調製したアグロバクテリウムを用いて、上記のアグロバクテリウムの機能を利用することにより、当該植物ゲノムに導入を所望する遺伝子を植物ゲノム中に導入する方法である。
- [0004] アグロバクテリウム属細菌は双子葉植物のみを宿主とし、単子葉植物には寄生しないとされていたため、当初、アグロバクテリウム法による植物の形質転換法は主として双子葉植物の形質転換法として発展した。単子葉植物へのアグロバクテリウム法による遺伝子導入についても様々な試みがなされ、強病原性アグロバクテリウムの病原性遺伝子の一部を有するスーパーバイナリーベクターが開発され、このベクターを用いた方法においては、イネ、トウモロコシなどの単子葉植物においても安定して、比較的効率よく形質転換されることが報告された(Hiei, et al. , 1994; Ishida, et al. , 1996; 特許第2, 649, 287号; 特許第3, 329, 819号)。さらに、コムギ、オオムギおよびソルガムといった単子葉植物についてもアグロバクテリウム法による形質転換の成功例が報告され、単子葉植物についてもアグロバクテリウム法による形質転換が

広く行われるに至った。

- [0005] アグロバクテリウムによる形質転換法は、一般的に、効率が高い、導入される遺伝子のコピー数が少ない、T-DNAという特定の領域を断片化させることなく導入できる、短期間の培養により形質転換体を得ることができるため培養変異が少ないなど、多くの優れた特徴を持っている。このため、現在では双子葉、単子葉を問わず多くの植物種で最も有用な形質転換の手段として広く用いられている。
- [0006] アグロバクテリウムによる形質転換方法は、植物種により供試材料、培養培地の組成は異なるが、いずれの植物においても材料となる組織にアグロバクテリウム懸濁液を接触させ、共存培養の後に形質転換細胞の選抜を行い、形質転換植物を作出する点は共通している。一般に、材料となる植物組織は、必要に応じ滅菌処理がなされるが、それ以外に特別な処理をすることなくアグロバクテリウムの感染が行われる (Rogers et al. 1988, Visser 1991, McCormick 1991, Lindsey et al. 1991)。
- [0007] アグロバクテリウムによる形質転換は多くの植物種で報告されているが、その形質転換効率は植物の種、遺伝子型そして材料となる組織により大きく異なる (Potrykus et al. 1998) という問題を有する。実用遺伝子を導入した品種を育成する場合、多数の形質転換植物を作出する必要がある、一年を通じて高い効率で、安定して形質転換植物の得られる技術の開発は重要である。また、植物の種や遺伝子型によらない形質転換法は、効率的に実用品種を育成する上で極めて有用である。さらに、材料となる植物組織によらない形質転換法の開発も、形質転換を効率的に進める上で必要である。
- [0008] このように遺伝子導入効率を向上させる、あるいは遺伝子導入が困難な植物種や遺伝子型も形質転換できる方法の開発は重要であり、現在までに多くの報告がなされている。しかし、その多くは、培地組成やマーカー遺伝子、プロモーターの改変あるいは供試材料の検討によるものである。アグロバクテリウム感染前の植物組織を遺伝子導入に適した状態にする処理方法を検討した例もあるが、それらはメス (Chan et al. 1993)、パーティクルガン (Tingay et al. 1997)、超音波 (Trick and Finer 1997, Amoah et al. 2001)、酵素処理 (Weber et al. 2003)

などにより、いずれも組織を付傷することで感染効率を向上させるものである。

[0009] Hieiらは、植物組織を遠心処理した後、アグロバクテリウムにより遺伝子導入を行うことにより無処理の組織に比べ高い効率で形質転換のなされることを見出した(WO 02/12520、特開2000-342256)。遠心処理による形質転換効率の向上は機構の詳細は不明であるが、上述の物理的に組織を付傷する方法とは異なり、遠心処理することで遺伝子導入が生じやすい生理状態に細胞が変化したものであると考えられる。同様に、熱処理、あるいは遠心処理と熱処理の双方を施した場合も、無処理の組織に比べ高い効率で形質転換のなされることを見出されている(特開2000-342255、特開2000-342253)。

[0010] Teasdaleらは感染性のある形質転換ベクターを含む培地に植物組織を浸漬し、減圧あるいは／また加圧を行う形質転換方法を特許出願した(WO 99/48335)。Teasdaleらは、加圧処理は形質転換ベクターの植物組織への浸透を促すために行われるとしている。しかし、その実験例では減圧処理を行った例は記載されているものの、加圧処理を行った例の記載はない。従って、実際に加圧処理が遺伝子導入効率を向上させる効果のあることを裏付けるデータは全く示されていない。

[0011] Pullman and Peterは加圧条件下で植物組織を培養することによりエンブリオジェニックなカルスの形成率を高める方法を特許出願した(US 6, 492, 174)。加圧強度1-2.5atmを8週間の培養期間中加えた試験では1.5atmでの培養が最も高いカルス形成率を示したとしている。また、その他の試験は全て1.5atmという極く低い加圧条件下で行われている。加圧処理が遺伝子導入に及ぼす効果についての記載はなされていない。

特許文献1:国際特許公開公報 WO 02/12520

特許文献2:国際特許公開公報 WO 99/48355

特許文献3:米国特許公報 第6, 492, 174号

特許文献4:特許公報 第2, 649, 287号

特許文献5:特許公報 第3, 329, 819号

特許文献6:特開2000-342256

特許文献7:特開2000-342255

特許文献8:特開2000-342253

特許文献9:国際特許公開公報 WO 95/06722

特許文献10:国際特許公開公報 WO03/027290

非特許文献1:Amoah, B. K., Wu, H., Sparks, C. and Jones, H. D. (2001) Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transient expression of uidA in wheat inflorescence tissue. *Journal of Experimental Botany* 52:1135-1142.

非特許文献2:Chan, M-T., Cheng, H-H., Ho, S-L., Tong, W-F. and Yu, S-M. (1993) *Agrobacterium*-mediated production of transgenic rice plants expressing a chimeric  $\alpha$ -amylase promoter /  $\beta$ -glucuronidase gene. *Plant Molecular Biology*, 22, 491-506.

非特許文献3:Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T. and Kumashiro, T. (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *The Plant Journal*, 6, 271-282.

非特許文献4:Hoekema, A., Hirsch, P. R., Hooykaas, P. J. J. and Schilperoort, R. A. (1983) A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature*, 303, 179-180.

非特許文献5:Ishida, Y., Saito, H., Ohta, S., Hiei, Y., Komari, T. and Kumashiro, T. (1996) High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Biotech.* 14:745-750.

非特許文献6:Komari, T. (1990) Genetic characterization of a double-flowered tobacco plant obtained in a transformation experiment. *Theor. Appl. Genet.* 80:167-171.

非特許文献7:Komari, T. and Kubo, T. (1999) *Methods of Genet*

ic Transformation: *Agrobacterium tumefaciens*. In Vasil, I. K. (ed.) Molecular improvement of cereal crops. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 43–82.

非特許文献8:Lindsey, K., Gallois, P. and Eady, C. (1991) Regeneration and transformation of sugarbeet by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Tissue Culture Manual B7:1–13. Kluwer Academic Publishers.

非特許文献9:McCormick, S. (1991) Transformation of tomato with *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Tissue Culture Manual B6:1–9. Kluwer Academic Publishers.

非特許文献10:Potrykus, I., Bilang, R., Futterer, J., Sautter, C. and Schrott, M. (1998) Agricultural Biotechnology, NY: Marcel Dekker Inc. pp. 119–159.

非特許文献11:Rogers, S. G., Horsch, R. B. and Fraley, R. T. (1988) Gene transfer in plants: Production of transformed plants using Ti plasmid vectors. Method for Plant Molecular Biology, C A: Academic Press Inc. pp. 423–436.

非特許文献12:Tingay, S., McElroy, D., Kalla, R., Fieg, S., Wang, M., Thornton, S. and Brettell, R. (1997) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation. The Plant Journal 11:1369–1376.

非特許文献13:Trick, H. N. and Finer, J. J. (1997) SAAT: sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation. Transgenic Research 6:329–336.

非特許文献14:Visser, R. G. F. (1991) Regeneration and transformation of potato by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Tissue Culture Manual B5:1–9. Kluwer Academic Publishers.

非特許文献15:Weber, S., Friedt, W., Landes, N., Molinier, J.

, Himber, C., Rousselin, P., Hahne, G. and Horn, R. (2003) Improved Agrobacterium-mediated transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.): assessment of macerating enzymes and sonication. *Plant Cell Reports* 21:475-482.

## 発明の開示

### 発明が解決しようとする課題

[0012] 本発明は、アグロバクテリウム属細菌を介して植物材料への遺伝子導入を行う方法を提供する。本発明の方法は、

- 1) 植物材料を加圧処理し、次いで
- 2) 植物材料をアグロバクテリウムに感染させる

ことを含む、ことを特徴とする。本発明の方法は、工程1)の加圧処理を行わない場合と比較して、遺伝子導入効率が向上する。

### 課題を解決するための手段

[0013] 本発明者らは、上記問題解決のため鋭意研究に努めた結果、植物組織を加圧処理後、アグロバクテリウム細菌と共存培養することにより、無処理の組織に比べ、安定して高い効率で遺伝子導入のなされることを見いだした。さらに、加圧処理による遺伝子導入効率向上の効果は、単子葉、双子葉を問わず認められることを確認した。また、遺伝子導入された植物材料について、さらに、形質転換細胞の選抜及び形質転換植物の再分化を行ったところ、加圧処理した材料は無処理の材料に比べ、飛躍的に形質転換効率が向上することを見いだした。さらに、加圧処理することにより植物組織の増殖(例えば、未熟胚からのカルス増殖)が旺盛になることを明らかにした。

[0014] よって、本発明は、アグロバクテリウム属細菌を介して植物材料への遺伝子導入を行う方法であって、

- 1) 植物材料を加圧処理し、次いで
- 2) 植物材料をアグロバクテリウムに感染させる

ことを含む、方法に関する。即ち、本発明において、植物材料の加圧処理は、アグロバクテリウムの感染と同時ではなく、その前に行われる。

[0015] 加圧処理は、限定されるわけではないが、好ましくは1.7気圧ないし10気圧の範

囲、より好ましくは2.4気圧ないし8気圧の範囲で行われる。最も好ましくは、4気圧から8気圧である。上記加圧処理の範囲は常圧を1気圧としたときのものである。従って、例えば、1.7気圧の加圧処理とは常圧に0.7気圧の圧を加えた状態を示し、同様に10気圧の加圧処理とは常圧プラス9気圧の状態を示す。また、加圧処理時間は、限定されるわけではないが、好ましくは0.1秒間ないし4時間、より好ましくは1秒間ないし30分間行う。

- [0016] 加圧処理は、液体中又は気体中のいずれで行ってもよい。液体は、非限定的に、水(例えば、滅菌蒸留水)、液体培地、その他植物組織の生育を阻害しない液体等を使用可能である。気体は、非限定的に、空气中、酸素中、その他植物組織の生育を阻害しない気体等を使用可能である。
- [0017] 加圧処理の方法は、例えば、注射器を組み合わせ、クランプで注射器をはさみ、クランプを狭めることにより注射器内の圧を高めることによって行うことができる。加圧の強度は、例えば、注射器内の空気の体積の減少率から算出できる。あるいは、加圧処理は、1)植物組織を含む容器にコンプレッサー等で気体を送り、容器の内圧を高める、または、2)外気と接しないように密封した袋等に入れた植物組織を液体中に沈下し、水圧により加圧する、ことによって行っても良い。
- [0018] 本発明の方法は、アグロバクテリウム属細菌に感染させる植物材料として、加圧処理したものをを用いることを特徴とするものであり、アグロバクテリウム属細菌を用いた遺伝子導入あるいは形質転換方法自体としては、周知の方法をそのまま適用することが可能である。
- [0019] アグロバクテリウム属細菌を用いた遺伝子導入及び形質転換方法  
アグロバクテリウム属細菌を用いた遺伝子導入は、一般には以下の工程を含む：  
a)植物材料を調製する工程；  
b)所望の導入遺伝子を含むベクターを含むアグロバクテリウム属細菌を調製する工程；  
c)工程a)で調製した植物材料をb)で調製したアグロバクテリウム属細菌に感染させる工程。
- [0020] さらに、形質転換体を得るために、上記工程c)に次いで

- d) 形質転換細胞を選抜する工程;及び
  - e) 所望により選抜された形質転換体を再分化する工程
- を施してもよい。

[0021] 工程a)について

本明細書に遺伝子導入に供される「植物」は、単子葉植物および双子葉植物のいずれも含む。単子葉植物には、イネ、トウモロコシ、オオムギ、コムギ、アスパラガス、ソルガム、その他が含まれるがこれらに限定されるものではない。好ましくは、イネ又はトウモロコシである。双子葉植物にはタバコ、ダイズ、ジャガイモ、ヒマワリ、その他が含まれるがこれらに限定されるものではない。好ましくは、タバコである。

[0022] また、「植物材料」とは、非限定的に、アグロバクテリウム法による植物の形質転換に供するための当該植物の細胞、葉、根、茎、実、その他いずれの部位の植物組織、未熟胚、カルスもしくは不定胚様組織(以下、本明細書においてカルス等、または単にカルスという)、または完全な植物体など植物のあらゆる態様を包含する。

[0023] 本発明の方法に用いる植物の形態として望ましいのは未熟胚またはカルスであり、最も望ましいのは未熟胚である。本明細書において、植物の細胞、組織、完全な植物体という表現は、技術分野において一般的に用いられる意味で用いられる。本明細書において、未熟胚とは、受粉後の登熟過程にある未熟種子の胚をいう。また、本発明の方法に供される未熟胚のステージ(熟期)は特に限定されるものではなく、受粉後いかなる時期に採取されたものであってもよい。もっとも、受粉後2日以降のものが好ましい。形質転換後、正常な個体を再生する能力を有するカルスを誘導できる、未熟胚胚盤を用いることが好ましい。また、未熟胚はインブレッド、インブレッド間のF1、インブレッドと自然受粉品種間のF1、市販F1品種の未熟胚であることが好ましい。本明細書において、カルスとは、無秩序に増殖する未分化状態の細胞塊をいう。カルスを得るためには、植物組織の分化した細胞をオーキシン(例えば、2, 4-D(2, 4-ジクロロフェノキシ酢酸))またはサイトカイニン等の植物成長調節物質を含む培地(脱分化培地という)において培養して得ることができる。このカルスを得るための処理を脱分化処理といい、またこの過程を脱分化過程という。

[0024] 工程a)において、必要に応じ、植物組織、未熟胚などを植物体、種子などから取り



出し、形質転換に最適な材料を調製する。また、所望により植物材料をアグロバクテリウムに感染させる前に培養してもよい。

[0025] 本発明では、工程a)で植物材料を調製する過程、あるいは調製後、工程c)でアグロバクテリウムに感染させる前に、植物材料に加圧処理を施すことを特徴とする。

[0026] 工程b)について

土壌細菌アグロバクテリウム(*Agrobacterium tumefaciens*)が多くの双子葉植物に根頭癌腫病(crown gall disease)を引き起こすことは古くから知られており、1970年代には、Tiプラスミドが病原性に関与すること、さらにTiプラスミドの一部であるT-DNAが植物ゲノムに組み込まれることが発見された。その後このT-DNAには癌腫の誘発に必要なホルモン(サイトカイニンとオーキシシン)の合成に関与する遺伝子が存在し、細菌遺伝子でありながら植物中で発現することが明らかにされた。T-DNAの切り出しと植物への伝達にはTiプラスミド上のヴィルレンス領域(vir領域)に存在する遺伝子群が必要であり、またT-DNAが切り出されるためにはT-DNAの両端に存在するボーダー配列が必要である。他のアグロバクテリウム属細菌である*Agrobacterium rhizogenes*もRiプラスミドによる同様なシステムを有している(例えば、特開2000-342256図3及び図4)。

[0027] アグロバクテリウムの感染によってT-DNAが植物ゲノムに組み込まれるので、T-DNA上に所望の遺伝子を挿入するとこの遺伝子も植物ゲノムに組み込まれることが期待された。しかしながら、Tiプラスミドは190kb以上と巨大であるため、標準的な遺伝子工学手法ではプラスミド上のT-DNA上に遺伝子を挿入することは困難であった。そのため、T-DNA上に外来遺伝子を挿入するための方法が開発された。

[0028] まず、腫瘍性のTiプラスミドのT-DNAからホルモン合成遺伝子が除去されたディスアーム型の菌系(disarmed strains)であるLBA4404(Hoekema et al., 1983)、C58C1(pGV3850)、GV3Ti11SEなどが作製された。これらを用いることにより、所望の遺伝子をアグロバクテリウムのTiプラスミドのT-DNA中に、あるいは所望の遺伝子を有するT-DNAをアグロバクテリウムに導入する2種類の方法が開発された。このうちの一つは、遺伝子操作が容易で所望の遺伝子の挿入が可能であり、大腸菌で複製ができる中間ベクターを、アグロバクテリウムのディスアーム型Tiプ

ラスミドのT-DNA領域中に、三系交雑法(triparental mating)を介して相同組換えにより導入する方法であり、中間ベクター法と呼ばれる。

- [0029] もう一つは、バイナリーベクター(binary vector)法とよばれるもので、T-DNAの植物への組み込みにvir領域が必要であるが、機能するために同じプラスミド上に存在する必要はないという結果に基づいている。このvir領域にはvirA、virB、virC、virD、virE及びvirGが存在し、(植物バイオテクノロジー事典(エンタプライズ株式会社発行(1989))), vir領域とはこのvirA、virB、virC、virD、virE及びvirGの全てを含むものをいう。したがって、バイナリーベクターは、T-DNAをアグロバクテリウムと大腸菌の両方で複製可能な小さなプラスミドに組み込んだものであり、これをディスアーム型Tiプラスミドを有するアグロバクテリウムに導入して用いる。
- [0030] アグロバクテリウムへのバイナリーベクターの導入には、エレクトロポレーション法や三系交雑法などの、公知の方法により行うことができる。バイナリーベクターには、pBIN19、pBI121、pGA482などがあり、これらをもとに数多くの新たなバイナリーベクターが構築され、形質転換に用いられている。また、Ri プラスミドのシステムにおいても、同様なベクターが構築され形質転換に用いられている。
- [0031] アグロバクテリウムA281は、強病原性(super-virulent)の菌系であり、その宿主範囲は広く、形質転換効率も他の菌系より高い。この特性は、A281が有するTiプラスミドのpTiBo542によるものである。pTiBo542を用いて、これまでに2つの新しいシステムが開発されている。一つはpTiBo542のディスアーム型のTiプラスミドを有する菌系EHA101およびEHA105を用いたものであり、これらを上述のバイナリーベクターシステムに適用することにより、形質転換能力の高いシステムとして種々の植物の形質転換に利用されている。
- [0032] もう一つは、スーパーバイナリーベクター('super-binary' vector) (Hiei et al. (1994); Ishida et al. (1996); Komari et al. (1999); WO95/06722)システムである(例:特開2000-342256の図4)。このシステムは、vir領域(virA、virB、virC、virD、virE及びvirG(以下、これらをそれぞれ「vir断片領域」ということもある。))を持つディスアーム型のTiプラスミドおよびT-DNAを有するプラスミドからなることから、バイナリーベクターシステムの一つである。しかしながら、T-DNA

を有する側のプラスミド、即ちバイナリーベクターにvir断片領域のうち、少なくとも一つのvir断片領域を実質的に取除いたvir領域の断片(このうち好ましくは少なくともvirB又はvirGを含む断片、さらに好ましくはvirB及びvirGを含む断片)を組み込んだスーパーバイナリーベクターを用いる点で異なる。なお、スーパーバイナリーベクターを有するアグロバクテリウムに、所望の遺伝子を組み込んだT-DNA領域を導入するには、三系交雑法を介した相同組換えが容易な手法として利用できる。

[0033] 本発明の方法においては、宿主となるアグロバクテリウム属細菌としては、特に限定されないが、*Agrobacterium tumefaciens* (例えば上述の*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404(Hoekema et al., 1983)およびEHA101を好ましく用いることができる。

[0034] 本発明の方法によれば、アグロバクテリウム属細菌における病原性(vir)領域の遺伝子群の発現に基づく遺伝子導入系であれば、特に限定されることなく有意な効果を得ることができる。したがって、上述の中間ベクター、バイナリーベクター、強病原性のバイナリーベクター、スーパーバイナリーベクターなどいずれのベクターシステムに対しても用いることができ、本発明による効果を得ることができる。これらのベクター類を改変した異なるベクターシステムを用いた場合においても同様である(例えば、アグロバクテリウム属細菌のvir領域の一部または全部を切り出し付加的にプラスミド中に組み込む、vir領域の一部または全部を切り出し新たなプラスミドの一部としてアグロバクテリウムに導入するなど)。また、本発明の方法によれば、野生型のアグロバクテリウム属細菌においても、植物へ野生型のT-DNA領域の導入効率を高め、事実上感染効率を向上させることができる。

[0035] 植物に導入しようとする所望の遺伝子は、上記プラスミドのT-DNA領域中の制限酵素部位に常法により組み込むことができ、当該プラスミドに同時に若しくは別途組込んだカナマイシン、パロモマイシン等の薬剤に対する耐性を有する遺伝子等の適当な選択マーカーに基づいて選択することができる。大型で多数の制限部位を持つものは、通常サブクローニングの手法では所望のDNAをT-DNA領域内に導入することが必ずしも容易でないことがある。このような場合には、三系交雑法により、アグロバクテリウム属細菌の細胞内での相同組換えを利用することで目的のDNAを導

入することができる。限定されるわけではないが、導入される遺伝子の大きさは好ましくは約100bpないし200kbpである。

[0036] また、プラスミドを*Agrobacterium tumefaciens*等のアグロバクテリウム属細菌に導入する操作は従来法により行うことができ、例としては、上記した三系交雑法やエレクトロポレーション法、エレクトロインジェクション法、PEGなどの化学的な処理による方法などが含まれる。

[0037] 植物に導入しようとする遺伝子は、従来の技術と同様に基本的にはT-DNAの左右境界配列の間に配置されるものである。しかし、プラスミドが環状であるため、境界配列の数は1つでもよく、複数の遺伝子を異なる部位に配置しようとする場合には、境界配列が3個以上あってもよい。また、アグロバクテリウム属細菌中で、TiまたはRiプラスミド上に配置されてもよく、または他のプラスミド上に配置されてもよい。さらには、複数の種類のプラスミド上に配置されてもよい。

[0038] 工程c)について

アグロバクテリウム属細菌を介して遺伝子導入を行う方法は、植物材料をアグロバクテリウム属細菌と単に接触させることにより行うことができる。例えば、 $10^6$  ～  $10^{11}$  細胞/ml程度の細胞濃度のアグロバクテリウム属細菌懸濁液を調製し、この懸濁液中に植物材料を3～10分間程度浸漬後、固体培地上で数日間共存培養することにより行うことができる。

[0039] 好ましくは、植物材料をアグロバクテリウムに感染させると同時に、あるいは感染後、アグロバクテリウムを除去する前に、植物材料をアグロバクテリウムと共存培養させる。培養用の液は公知の培地を使用できる。例えば、実施例で使用したnN6-As培地、nNB-As培地、LS-AS培地あるいはその他、N6S3-AS培地、2N6-AS培地 (Hiei et al. 1994) 等の培地が知られている。

[0040] 本発明において、植物材料をアグロバクテリウムに感染させる工程c)の前又は最中に、熱処理、遠心処理、超音波処理からなるグループから選択される、少なくとも1つの処理を植物材料に行ってもよい。これらの処理も、アグロバクテリウム属細菌を介して植物材料への遺伝子導入する方法において、遺伝子導入の効率を高めることが知られている。例えば、遠心処理については、例えば、WO 02/12520、特開20

00-342256に記載されており、好ましくは、100Gないし25万Gで1秒間ないし4時間、遠心することで行う。熱処理については、例えば、特開2000-342255に記載されており、好ましくは、33℃ないし60℃の温度範囲で、5秒間ないし24時間の熱処理を行う。さらに、超音波処理については、例えば、Trick and Finer 1997, Amoah et al. 2001に記載されている。

[0041] これらの加圧、加熱、遠心等の処理はいずれか1つを行ってもよく、また複数組み合わせを行ってもよい。例えば、特開2000-342253は、熱処理と遠心処理を組み合わせで行うことについて記載している。

[0042] 工程d)及びe)について

さらに所望により、形質転換体を得るためには、上記工程c)に次いで

d)形質転換細胞を選抜する工程;及び

e)所望により選抜された形質転換体を再分化する工程

が必要である。即ち、一般に植物の形質転換を行うためには、植物細胞に外来遺伝子を導入した後に、外来遺伝子が安定して染色体に組み込まれた植物細胞を選抜することが必要である。

[0043] 形質転換された細胞を選抜する工程は、表現型のデータ及び物理的データの少なくとも一つ、好ましくは両方が目的の形質を有する細胞を選択する、ことを意味する。

[0044] 表現型のデータは、例えば、形質転換効率は植物への導入を所望する遺伝子と共に、マーカー遺伝子および/または選抜マーカー遺伝子を導入してその発現を評価することで行うことで得ることができる。マーカー遺伝子および/または選抜マーカー遺伝子としては、例えば、GUS( $\beta$ -グルクロニダーゼ)遺伝子を用いたり、抗生物質耐性遺伝子(例えば、PPT(フォスフィノスライシン)耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子)などを用いることができる。マーカー遺伝子としてGUS遺伝子を用いた場合、形質転換効率の評価はX-gulc(5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -D-グルクロン酸)のGUSによる切断に伴う発色から評価することができる。選抜マーカー遺伝子として抗生物質耐性遺伝子を用いた場合には、形質転換した後、抗生物質を加えた選抜培地上での成長の度合いから評価することができる。

[0045] さらに、外来遺伝子が安定して染色体に組み込まれたことを確認するためには、サ

ザンブロット等の物理的データを得ることが好ましい。より好ましくは、有性生殖による子孫への伝達、並びに子孫集団への遺伝的および分子的分析に基づく選抜、の工程を行ってもよい。

- [0046] 所望により選抜された形質転換体の再分化を行い、再分化個体を生育させ、そして完全な植物体を得てもよい。選抜した形質転換細胞から完全な植物体を再生するには、公知の方法(例えば、Hiei et al. 1994, Ishida et al. 1996)により行うことができる。
- [0047] 本発明の方法は、加圧処理を行わない場合と比較して、遺伝子導入効率及び／又は形質転換効率を向上させる。遺伝子導入効率は、例えば、導入した遺伝子の一過性の発現の範囲を調査することによって評価できる。後述の実施例では、未熟胚の胚盤でのGUS遺伝子の一過性の発現を1(スポット状の発現が散見)〜5(胚盤の全面で発現)の5段階の指数で評価した。あるいは、全体の発現量が低い場合には全てのスポット数を数えることにより評価することもできる。
- [0048] 形質転換効率は、例えば、接種した未熟胚から得られた再分化植物のうちGUS遺伝子の発現を示したものを形質転換体として数え、その総数を接種した未熟胚の数で除することによって算出した。あるいは、再分化植物のうち選抜圧にたいし抵抗性を示したものを形質転換体として数え、その総数を接種した未熟胚の数で除することにより算出することもできる。
- [0049] 本発明はまた、形質転換植物を生産するための方法を提供する。本発明の方法は、
- 1) 植物材料を加圧処理し、
  - 2) 植物材料をアグロバクテリウムに感染させ
  - 3) 形質転換細胞を選抜し、そして
  - 4) 所望により選抜された形質転換体を再分化する
- ことを含む。

## 効果

- [0050] 本発明は、従来のアグロバクテリウム法よりも高い効率で遺伝子導入のなされる安価で簡便な方法を開発する。また、従来のアグロバクテリウム法では遺伝子導入が困

難とされていた植物種及び品種にも適応できる方法を提供する。本発明の方法は、加圧処理を行わない場合と比較して、遺伝子導入効率及び／又は形質転換効率を向上させる。

- [0051] 図1に示したように、単子葉植物であるイネにおいて加圧処理を行うことにより、未処理の場合と比較して遺伝子導入効率は2倍ないし3倍に向上した。また、図3に示したように、双子葉植物であるタバコにおいて、加圧処理を行うことにより、未処理の場合と比較して遺伝子導入効率は3倍ないし4倍に向上した。よって、本発明の方法を使用することによって、好ましくは遺伝子導入効率が実質的に向上するが、より好ましくは、2倍以上向上する。さらに形質転換効率は、表1に示されたようにイネにおいて、加圧処理を行うことにより、未処理の場合と比較して3倍ないし9倍に上昇した。よって、本発明の方法を使用することによって、好ましくは形質転換効率が実質的に向上するが、より好ましくは、3倍以上向上する。

#### 図面の簡単な説明

- [0052] [図1]図1は、気体中での加圧処理の遺伝子導入効率に及ぼす効果(イネ、品種:ゆきひかり)を示す。control:前処理なしpres. w/o water: 気体中+5.7 atm, 5分間加圧処理pres. in water: 蒸留水中+6.6 atm, 5分間加圧処理各処理後、LBA4404 (pSB134)を接種、7日間共存培養を行った後、GUS分析した。

[図2]図2は、加圧処理の遺伝子導入に及ぼす効果(トウモロコシ)を示す。A:前処理なし(対照)、B: 15,000 rpm、10分間遠心処理、C: +3.2 atm、10分間加圧処理、D: +6.6 atm, 5分間加圧処理各処理後、LBA4404 (pSB131)を接種、3日間共存培養を行った後、GUS分析した。

[図3]図3は、加圧処理の遺伝子導入効率に及ぼす効果(タバコ、品種:プチハバナSR1)を示す。control:前処理なし、pressure: +6.6 atm, 5分間加圧処理各処理後、LBA4404 (pSB134)を接種、4日間共存培養を行った後、GUS分析した。

#### 実施例

- [0053] 以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の技術的範

囲を限定するためのものではない。当業者は本明細書の記載に基づいて容易に本発明に修飾・変更を加えることができ、それらは本発明の技術的範囲に含まれる。

[0054] 実施例1 イネ形質転換に及ぼす加圧の効果

(1)加圧処理

5mlのディスポーザブル注射器の先端に先を過熱しつぶしたマイクロピペットのチップを差込み適当な長さで切り落とした後、パラフィルムで先端を覆った。注射器にアグロバクテリウム懸濁用液体培地(AA主要無機塩、LS微量無機塩、MSビタミン、AAアミノ酸、0.2g/lカザミノ酸、4g/lシュクロース、2g/lグルコース、pH 5.2)あるいは滅菌蒸留水3mlを入れ、その中に無菌的に採取した未熟胚(品種:コシヒカリ、朝の光)を入れた。また、培地や蒸留水などの液体を入れない注射器に採取した未熟胚(品種:ゆきひかり)を入れた。注射器を組み合わせ、クランプで注射器をはさみ、クランプを狭めることにより注射器内の圧を高めた。加圧したまま室温で静置した。加圧の強度は注射器内の空気の体積の減少率から算出した。対照はほぼ同数の未熟胚を液体培地あるいは滅菌蒸留水を入れた2mlエッペンドルフチューブに採取し、室温で静置した。

[0055] (2)接種

アグロバクテリウムの菌系及びアグロバクテリウムプラスミドベクターには、Agrobacterium tumefaciensスーパーバイナリーベクター LBA4404(pSB134)(T-DNA領域に、トウモロコシユビキチンプロモーターでドライブされたユビキチンイントロンを結合したHPT遺伝子およびカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターでドライブされたヒマカタラーゼイントロンを結合したGUS遺伝子を有する)を用いた。pSB134の作成は、pKY205(Komori et al. WO03/027290)に発現マーカーとしてpSB32由来の35S-intron GUS-nos断片をHindIII部位に挿入することによって行った。

[0056] 注射器をクランプから外し、注射器内の未熟胚を液体培地の入った2mlエッペンドルフチューブに移した。50mg/lハイグロマイシンおよび50mg/lスペクチノマイシンを含むAB培地上で3-4日間培養した、LBA4404(pSB134)を白金耳でかきとり、約 $10^9$ cfu/mlの濃度で100  $\mu$  Mアセトシリンゴンを含む液体培地1mlに懸濁し



た。液体培地を除いたエッペンドルフチューブにアグロバクテリウム懸濁液1mlを加え、30秒間ボルテックスミキサーで攪拌後、室温で5分間静置した。未熟胚をnN6-As培地(N6無機塩、N6ビタミン、0.5g/l カザミノ酸、0.5g/l L-プロリン、1mg/l 2, 4-D、0.5mg/l NAA、0.1mg/l 6BA、20g/l シュークロース、10g/l グルコース、10  $\mu$  M AgNO<sub>3</sub>、100  $\mu$  M アセトシリゴン、8g/l アガロース、pH 5.2)あるいはnNB-As培地(N6主要無機塩、B5微量無機塩、B5ビタミン、0.5g/lカザミノ酸、0.5g/l L-プロリン、2mg/l 2, 4-D、1mg/l NAA、1mg/l 6BA、20g/l シュークロース、10g/l グルコース、100  $\mu$  M アセトシリゴン、8g/l アガロース、pH 5.2)に置床し、暗黒下、25℃で1週間培養した。

[0057] (3)選抜、再分化

共存培養後の未熟胚をメスで4〜6分割し、nN6CC培地(N6無機塩、N6ビタミン、0.5g/lカザミノ酸、0.5g/l L-プロリン、1mg/l 2, 4-D、0.5mg/l NAA、0.1mg/l 6BA、20g/l シュークロース、55g/l ソルビトール、250mg/l セフトキシム、250mg/l カルベニシリン、5g/l ゲルライト、pH 5.8)あるいはNBK4CC(NBK4主要無機塩、B5微量無機塩、B5ビタミン、AAアミノ酸、0.5g/l カザミノ酸、0.5g/l L-プロリン、1mg/l 2, 4-D、0.5mg/l NAA、0.1mg/l 6BA、20g/l マルトース、55g/l ソルビトール、250mg/l セフトキシム、250mg/l カルベニシリン、5g/l ゲルライト、pH 5.8)に置床した。

[0058] 照明下28℃で1週間培養後、カルスを5分割し、ハイグロマイシン50mg/lを含むnN6CC培地あるいはNBK4CC培地に置床し、同条件で10日間培養した。増殖した細胞塊をハイグロマイシン50mg/lを含む再分化培地(N6無機塩、N6ビタミン、AAアミノ酸、1g/l カザミノ酸、0.5mg/l カイネチン、20g/l シュークロース、30g/l ソルビトール、4g/l ゲルライト、pH 5.8)あるいは(NBK4主要無機塩、B5微量無機塩、B5ビタミン、AAアミノ酸、1g/l カザミノ酸、2mg/l カイネチン、20g/l マルトース、30g/l ソルビトール、5g/l ゲルライト、pH 5.8)に置床し、同条件で約2週間培養した。

(4)GUSアッセイ

共存培養後の未熟胚および再分化個体から切り取った葉片を0.1%のTriton X

-100を含む0.1Mリン酸緩衝液(pH 6.8)に浸漬し、37℃で1時間静置した。リン酸緩衝液でアグロバクテリウムを除去した後、1.0mM 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-グルクロン酸(X-gluc)および20%メタノールを含むリン酸緩衝液を添加した。37℃で24時間処理した後、青色を呈する組織を顕微鏡下で観察した。

[0059] (5)形質転換効率の算出

形質転換効率の算出は、具体的には以下のように行った。

[0060] アグロバクテリウムを接種したイネ未熟胚では、胚盤の広い範囲でGUS遺伝子の一過性の発現を示すスポットが観察される。1つの胚盤でも離れた部位で観察されるスポットは個々に遺伝子導入のなされた独立の形質転換細胞に由来するものであると考えられる。共存培養後およびレステイング培養後に増殖した未熟胚を4から6の塊に分割した場合、由来は1つの未熟胚であっても分割して得られた20〜30の細胞塊からハイグロマイシン存在下で増殖してきたカルスおよびその再分化植物はそれぞれ独立の形質転換体であると考えられる。

[0061] 分割して得られた細胞塊から増殖したハイグロマイシン抵抗性カルスを1細胞塊から1カルス選び、ハイグロマイシンを含む再分化培地に置床した。そこから得られた再分化植物のうちGUS遺伝子の発現を示したものを形質転換体として数え、その総数を接種した未熟胚の数で除し、形質転換効率を算出した。

[0062] (6)加圧強度の遺伝子導入効率に及ぼす効果

採取したコシヒカリ未熟胚を液体培地の入った注射器に入れ、0(常圧)、0.6, 1.4, 3.2, 6.6atmの圧をそれぞれ15分間加えた後、アグロバクテリウム懸濁液に浸漬した。共存培地上で1週間培養した後、GUS遺伝子の一過性の発現を調査した。常圧で処理した対照の未熟胚では胚盤の約半分が青色に染色される未熟胚も散見されたが、多くのものは胚盤表面にスポット状の発現を示した。0.6atmの強度で加圧した未熟胚は対照の未熟胚と同様の発現様式を示した。これに対し、1.4atmの強度で加圧した未熟胚の約半数は胚盤の約半分が青色に染色された。さらに3.2および6.6atmの強度で加圧した未熟胚はほとんどのものが胚盤の全面が青色に染色され、遺伝子導入効率が著しく向上していることが示された。

[0063] (7)加圧時間の遺伝子導入効率に及ぼす効果

採取したコシヒカリ未熟胚を液体培地の入った注射器に入れ、+6.6atmの圧を0、1、3、5又は60秒間加えた後、アグロバクテリウム懸濁液に浸漬した。共存培地上で1週間培養した後、GUS遺伝子の一過性の発現を調査した。0秒(常圧)で処理した対照の未熟胚は胚盤表面にスポット状の発現を示した。これに対し、+6.6atmの強度で1秒間加圧した未熟胚はそのほとんどが胚盤の全面での一過性の遺伝子発現を示した。3秒間以上加圧した未熟胚においても1秒間と同様の発現様式を示し、極めて短時間の加圧処理でも遺伝子導入効率を著しく向上させる効果のあることが示された。

[0064] (8)アグロバクテリウム共存・非共存下での加圧処理の形質転換効率の及ぼす効果

採取したコシヒカリ未熟胚を滅菌蒸留水、液体培地及びアグロバクテリウムLBA4404(pSB134)菌を約 $1 \times 10^9$  cfu/mlで懸濁したアセトシリゴン $100 \mu$  Mを含む液体培地の入った注射器にそれぞれ入れ、+6.6atmの強度で15分間加圧した。アグロバクテリウム懸濁液中で加圧した未熟胚は、加圧後、共存培地に置床した。滅菌蒸留水及び液体培地中で加圧した未熟胚は加圧後、アグロバクテリウム懸濁液に浸漬した後、共存培地に置床した。1週間共存培養した未熟胚のGUS遺伝子の一過性の発現を調査した。加圧処理をしない対照の未熟胚は一部の未熟胚で胚盤の約半分が青色を呈したが、ほとんどの未熟胚はスポット状の発現を示した。これに対し、加圧処理した未熟胚では、アグロバクテリウムと共存させる、させないに関わらず分析に供した未熟胚の全てが胚盤全面でGUS遺伝子の発現を示した。滅菌蒸留水、液体培地の間にも差は見られなかった。

[0065] 滅菌蒸留水中で加圧した未熟胚およびアグロバクテリウムとの共存下で加圧した未熟胚をハイグロマイシンを含む培地で培養し、形質転換植物の選抜、再分化を行った。滅菌蒸留水中で加圧した後に、アグロバクテリウムを接種した未熟胚12個からは、ハイグロマイシン抵抗性かつGUS陽性の形質転換植物は63系統得られた。形質転換効率は525%であった。一方、アグロバクテリウム懸濁液中で加圧処理した未熟胚12個からは54系統の形質転換植物が得られ、効率は450%であった。

[0066] アグロバクテリウムと共存させずに加圧した方がアグロバクテリウム共存下で加圧し

たときよりも形質転換効率が高かったことから、本法でみられた加圧処理による遺伝子導入効率向上の効果は加圧による植物組織へのアグロバクテリウムの浸透の促進によるものではないことが明らかとなった。すなわち本願発明はTeasdale et al. (WO 99/48335)の述べた機作とは全く別の働きにより遺伝子導入効率を高めるものであることが示された。

[0067] (9) 気体中での加圧処理の遺伝子導入効率に及ぼす効果

採取したゆきひかり未熟胚を液体を入れない注射器及び滅菌蒸留水を入れた注射器にそれぞれ入れた。液体を入れない注射器は+5.7atmの強度で5分間加圧した。滅菌蒸留水を入れた注射器は+6.6atmの強度で5分間加圧した。加圧した未熟胚を常圧に戻した後、アグロバクテリウム懸濁液に浸漬し、共存培地に置床した。対照の未熟胚は滅菌水中で常圧で5分間静置後、アグロバクテリウム懸濁液に浸漬し、共存培地に置床した。1週間共存培養した未熟胚の胚盤でのGUS遺伝子の一過性の発現を1(スポット状の発現が散見)〜5(胚盤の全面で発現)の5段階の指数で調査した。気体中で加圧した未熟胚での発現は蒸留水中で加圧した未熟胚に比べやや劣ったが、無処理の対照の未熟胚に比べ明らかに広範囲な発現を示した(図1)。

[0068] このように、加圧による遺伝子導入効率向上の効果はアグロバクテリウム接種前の植物組織を液体中で加圧した場合だけでなく、気体中で加圧した場合にも同様にみられることが明らかとなった。

[0069] (10) 加圧処理の形質転換効率に及ぼす効果

採取した未熟胚(品種:コシヒカリ、朝の光)を液体培地の入った注射器に入れ、+6.6atmの圧を15分間加えた後、アグロバクテリウム懸濁液に浸漬した。共存培地上で1週間培養した後、ハイグロマイシンを含む培地で培養し、形質転換植物の選抜、再分化を行った。再分化したハイグロマイシン抵抗性植物の葉の一部を切り取りGUS分析を行った。結果を表1に示す。

[0070] [表1]

表1 加圧処理の形質転換効率に及ぼす効果 (イネ、品種: コシヒカリ、朝の光)

品種	試験	処理	接種 未熟胚数 (A)	HmR, GUS+植物数 (B)	形質転換効率 (B/A) (%)
コシヒカリ	I	無処理	12	7	58.3
		加圧	12	66	550.0
コシヒカリ	II	無処理	12	17	141.7
		加圧	12	60	500.0
コシヒカリ	III	無処理	12	13	108.3
		加圧	12	42	350.0
朝の光	I	無処理	12	40	333.3
		加圧	12	119	991.7

HmR, GUS+: ハイグロマイシン抵抗性、GUS 陽性

加圧処理した未熟胚は無処理の未熟胚の3倍から9倍以上の形質転換効率を示し、加圧処理が形質転換効率の向上に極めて効果のあることが明らかとなった。

#### 実施例2 トウモロコシ形質転換に及ぼす加圧の効果

大きさ約1.2mmのトウモロコシ未熟胚(品種:A188)を無菌的に取り出し、アグロバクテリウム懸濁用液体培地(LS-inf, Ishida et al. 1996)に浸漬した。加圧処理は液体培地を入れた注射器に未熟胚を入れ、注射器を挟んだクランプの幅を狭めることにより行った。加圧の強度は+6.6atm、5分間あるいは+3.2atm、10分間で行った。遠心処理は液体培地を入れたエッペンドルフチューブに未熟胚を入れ、遠心機で15,000rpm、4℃、10分間遠心分離した。加圧あるいは遠心処理した未熟胚を、*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404(pSB131)菌株(Ishida et al. 1996)を約 $1 \times 10^9$ cfu/mlで懸濁したアセトシリゴン100  $\mu$ Mを含むLS-inf培地に浸漬後、LS-AS共存培地に置床した。25℃、暗黒下で3日間培養後、GUS分析を行った。対照の未熟胚は採取後、液体培地に浸漬した後、同方法によりアグロバクテリウムを接種した。

- [0071] 対照の未熟胚は胚盤表面に青色のスポット状にGUS遺伝子の一過性の発現を示した。加圧処理あるいは遠心処理した後、アグロバクテリウムを接種した未熟胚では胚盤の約1/3が全て青色に染色されるエリア状の発現を示した。特に+3.2atm、10分間加圧した未熟胚では胚盤の全面でGUS遺伝子の発現を示すものが複数みられた(図2)。アグロバクテリウム接種前の植物組織に遠心処理を行うことにより形質転換効率の高まることは既に報告されている(Hiei et al., WO02/12520)。

[0072] これらのことから加圧処理はイネだけでなく他の単子葉植物のトウモロコシにおいても遺伝子導入効率を向上させる働きのあること、そしてその効果は既報の遠心処理と同等かそれ以上であることが明らかとなった。

[0073] 実施例3 タバコ形質転換に及ぼす加圧の効果

タバコ(品種:プチハバナSR1)の展開葉を常法により滅菌した後、約1cm角の葉片とした。対照の葉片はAgrobacterium tumefaciens LBA4404(pSB134)を懸濁したLS-R培地(Komari, 1990)に浸漬し、25℃で15分間緩やかに振盪した後、LS-R培地に浸漬し、25℃、暗黒下で4日間培養した。加圧区の葉片はLS-R培地を入れた注射器内で+6.6atm、15分間加圧した後、対照の葉片と同様の方法でアグロバクテリウムを接種し、培養した。共存培養後の葉片をGUS分析した。

[0074] GUS分析後の各葉片の示すGUS遺伝子の発現部位の大きさにより、0(無発現)から3(葉片全体で発現)の4段階の指数で調査した。結果を図3に示す。対照の葉片では葉の切断部分でGUS発現を示す葉片が多くみられ、切断部より内部の広い範囲で発現を示す葉片はほとんどみられなかった。これに対し、加圧処理後アグロバクテリウムを接種した葉片では、ほとんどの葉片が切断部および内部の広い範囲で濃い青色を呈し、広範に遺伝子導入のなされていることが示された。このことから、加圧処理はイネ、トウモロコシなどの単子葉植物だけでなく、双子葉植物においても遺伝子導入効率を高める効果のあることが明らかとなった。

[0075] 実施例4 加圧処理のカルス増殖に及ぼす効果

採取したコシヒカリ未熟胚をアグロバクテリウム懸濁用液体培地中で+6.6atmの強度で15分間加圧した後、NBK4CC培地に置床した。対照の未熟胚は常圧下で同液体培地に浸漬後、NBK4CC培地に置床した。25℃、暗黒下で1週間培養後10個の未熟胚の生重を測定した。試験は5反復で行った。アグロバクテリウムの接種は両区とも行わなかった。結果を表2に示す。

[0076] [表2]

表2 加圧処理の細胞増殖に及ぼす効果（イネ、品種：コシヒカリ）

処理	未熟胚の生重 (mg/10 未熟胚)					平均±標準誤差
	反復1	反復2	反復3	反復4	反復5	
無処理	69.2	68.5	63.6	71.5	58.5	66.3±2.3
加圧	73.1	74.0	77.2	73.2	78.1	75.1±1.1

加圧処理後1週間培養した未熟胚の生重を調査した。

アグロバクテリウムの接種は行っていない。

対照の未熟胚を1週間培養したときの平均生重は66.3mg/10未熟胚であった。加圧処理した後、同期間培養した未熟胚では75.1mg/10未熟胚であり、有意な差が認められた。1週間培養した対照の未熟胚は胚盤表面がややカルス化し、淡い黄白色を呈した。これに対し、加圧処理した未熟胚ではコブ状のカルス化がみられ、対照よりも濃い黄白色を示した。肉眼での観察においても加圧処理した未熟胚の方がより旺盛に増殖していることが認められた。このように加圧処理は遺伝子導入効率を向上させるだけでなく、細胞の増殖を活発にする働きのあることが明らかとなった。

[0077] 本発明の効果のひとつである高圧力の短時間処理による植物組織の細胞増殖率の向上は、+0.5atmという低い圧力を1-10週間加えた状態で培養することによりエンブリオジェニックなカルスの形成率を高めるという米国特許第6,492,174号の方法とは、処理条件が異なるだけでなく、処理の結果として得られる効果も異なることから、別の機作によるものであると考えられる。

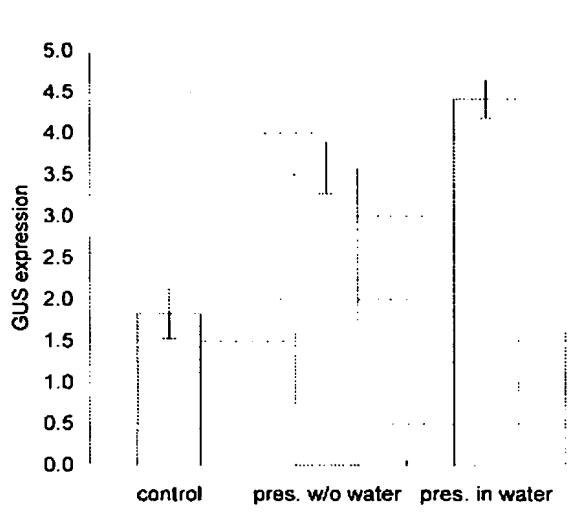
## 請求の範囲

- [1] アグロバクテリウム属細菌を介して植物材料への遺伝子導入を行う方法であって、  
1)植物材料を加圧処理し、次いで  
2)植物材料をアグロバクテリウムに感染させる  
ことを含む、前記方法。
- [2] 加圧処理が、1. 7気圧ないし10気圧の範囲で行われる、請求項1に記載の方法。
- [3] 加圧処理が、2. 4気圧ないし8気圧の範囲で行われる、請求項2に記載の方法。
- [4] 加圧処理が、0. 1秒間ないし4時間行われる、請求項1ないし3のいずれか1項に記載の方法。
- [5] 加圧処理が、1秒間ないし30分間行われる、請求項4に記載の方法。
- [6] 加圧処理が、液体中又は気体中のいずれかで行われる、請求項1ないし5のいずれか1項に記載の方法。
- [7] 植物材料をアグロバクテリウムに感染させる工程2)の前又は最中に、熱処理、遠心処理、超音波処理からなるグループから選択される、少なくとも1の処理を植物材料に行うことをさらに含む、請求項1ないし6のいずれか1項に記載の方法。
- [8] 植物材料が単子葉植物である、請求項1ないし7のいずれか1項に記載の方法。
- [9] 植物材料がイネ又はトウモロコシである、請求項1ないし7のいずれか1項に記載の方法。
- [10] 植物材料が双子葉植物である、請求項1ないし7のいずれか1項に記載の方法。
- [11] 植物材料がタバコである、請求項1ないし7のいずれか1項に記載の方法。
- [12] 植物材料が未熟胚である、請求項1ないし11のいずれか1項に記載の方法。
- [13] 植物材料をアグロバクテリウムに感染させる工程2)に次いで、さらに、  
3)形質転換体を選抜し、そして  
4)所望により選抜された形質転換株を再分化する  
工程を含む、請求項1ないし12に記載の方法。
- [14] 工程1)の加圧処理を行わない場合と比較して、遺伝子導入効率が向上する、請求項1ないし13のいずれか1項に記載の方法。
- [15] 1)植物材料を加圧処理し、

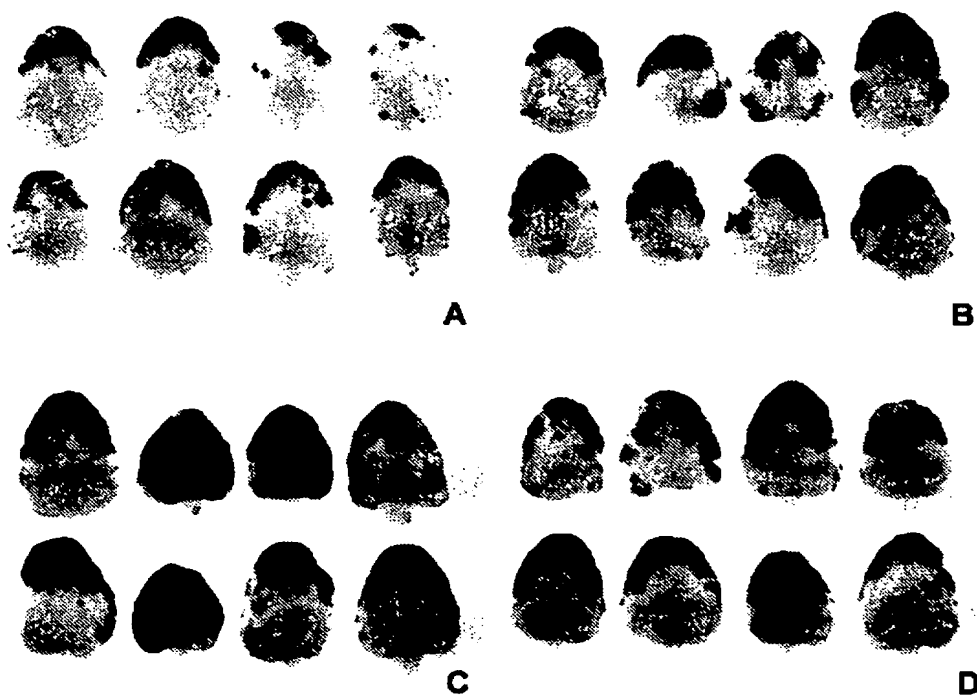


- 2) 植物材料をアグロバクテリウムに感染させ
  - 3) 形質転換細胞を選抜し、そして
  - 4) 所望により選抜された形質転換体を再分化する
- ことを含む、形質転換植物を生産するための方法。

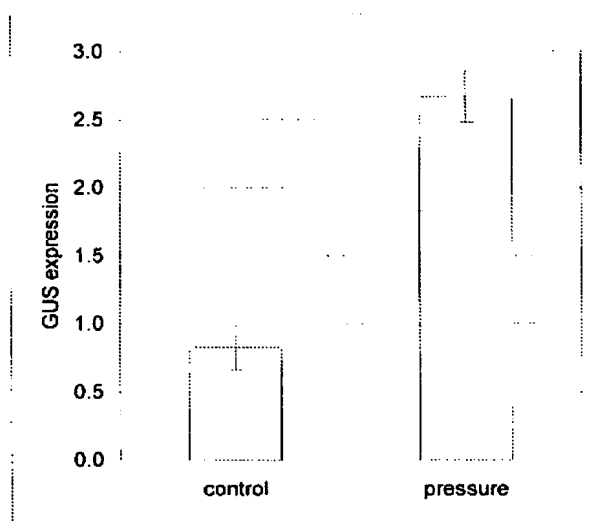
[図1]



[図2]



[図3]



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/011237

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/84, A01H1/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/84, A01H1/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/WPIDS (STN); PubMed, JSTPlus (JICST)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	JP 2002-534129 A (Monsanto Technology LLC.), 15 October, 2002 (15.10.02), Particularly, Claim 1; Par. No. [0020] & WO 00/42207 A2 & EP 1141346 A2 & US 6384301 B1 & US 2002/0157139 A1	1-7, 10-11, 13-15/7-9, 12
Y	JP 2000-342253 A (Japan Tobacco Inc.), 12 December, 2000 (12.12.00), Full text & WO 02/12521 A1 & EP 1306441 A1	7-9, 12
Y	JP 2000-342256 A (Japan Tobacco Inc.), 12 December, 2000 (12.12.00), Full text & WO 02/12520 A1 & EP 1306440 A1	7-9, 12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
18 August, 2004 (18.08.04)

Date of mailing of the international search report  
07 September, 2004 (07.09.04)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/011237

**C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2000-342255 A (Japan Tobacco Inc.), 12 December, 2000 (12.12.00), Full text (Family: none)	7-9, 12

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/84, A01H1/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/84, A01H1/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
BIOSIS/WPIDS (STN), PubMed, JSTPlus (JICST)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y	JP 2002-534129 A(モンサント テクノロジー エルエルシー) 2002. 10. 15, 特に, 請求項1および【0020】参照 & WO 00/42207 A2 & EP 1141346 A2 & US 6384301 B1 & US 2002/0157139 A1	1-7, 10-11, 13 -15/7-9, 12
Y	JP 2000-342253 A(日本たばこ産業株式会社)2000. 12. 12 全文 & WO 02/12521 A1 & EP 1306441 A1	7-9, 12
Y	JP 2000-342256 A(日本たばこ産業株式会社)2000. 12. 12 全文 & WO 02/12520 A1 & EP 1306440 A1	7-9, 12

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18. 08. 2004

国際調査報告の発送日

07. 9. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上條 肇

4 B

3 1 3 1

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 2000-342255 A(日本たばこ産業株式会社)2000. 12. 12 全文(ファミリーなし)	7-9, 12